

FACULTÉ DE MEDECINE DE PARIS

ANNÉE 1957

THÈSE ^{N°} 643

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

PAR

Anne MARTY

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

Née le 15 Janvier 1931 à PARIS

Présentée et soutenue publiquement, le 22 Juin 1957

MODIFICATIONS DE L'ÉLIMINATION
URINAIRE DES ACIDES DU CYCLE
TRICARBOXYLIQUE APRÈS CHARGE
EN DL-MALATE CHEZ L'HOMME NORMAL

Président : Monsieur Max-Fernand JAYLE (Professeur)

DACTYLO - SORBONNE

8, Rue Casimir - Delavigne

PARIS - VI^e

1957

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

-:-

Année 1957

N°

T H E S E

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

par

Anne MARTY

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

Née le 15 janvier 1931 à Paris

-:-

Présentée et soutenue publiquement
le 22 juin 1957

-:-

MODIFICATIONS DE L'ELIMINATION URINAIRE

DES ACIDES DU CYCLE TRICARBOXYLIQUE

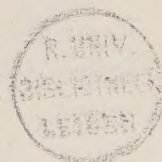
APRES CHARGE EN DL-MALATE CHEZ L'HOMME NORMAL

-:-

Président : Monsieur Max-Fernand JAYLE,
Professeur

-:-

DACTYLO - SORBONNE
8, rue Casimir Delavigne
PARIS
1957





Digitized by the Internet Archive
in 2026

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. BENARD, CADENAT, CARNOT, CHABROL, CHAMPY, CHEVASSU, DELBET, DONZELOT, GASTINEL, GUILLAIN, HALPHEN, HARVIER, LAROCHE G., LAUBRY, LEMAITRE, LEMIERRE, LEVY-SOLAL, LHERMITTE, LIAN, LOEPER, MARION, MATHIEU, MOCQUOT, MONDOR, MULON, OLIVIER, OMBREDANNE, SANNIE, SEZARY, TANON.

DOYEN.....Léon BINET
Membre de l'Institut
ASSESEUR.....Jean VERNE

I. PROFESSEURS

	MM
Anatomie.....	CORDIER
Anatomie pathologique.....	DELARUE
Bactériologie.....	FASQUELLE
Biologie app. à l'Education) phys. et aux Sports.....	CHAILLET-BERT
Biologie Médicale.....	FAUVERT
Cancérologie méd., sociale.....	BERNARD J
Carcinologie.....	N.
Chimie Méd.....	JAYLE
{ Hôtel Dieu.....	BROCQ
Clinique Chir. { Broussais.....	G.d'ALLAINES
{ Salpêtrière.....	MOULONGUET
{ Cochin.....	QUENU
Clinique Chir. réparatrice et orthop. }.....	{ MERLE d'AUBI- GNE
Clinique de Cardiologie.....	MOUQUIN
Clinique Chir. infantile et d'orthop.	FEVRE
Clinique Chir. pleuro-pulm.....	MONOD
Clinique de la Tuberculose.....	BERNARD Et.
Clinique de neuro-chir.....	{ PETIT- DUTAILLIS
Clinique de Puéricult.....	LELONG
Clinique des maladies cutanées } et syphilitiques.....	DEGOS
Clinique des mal. du sang.....	CHEVALLIER
Clinique mal. du système nerv.....	ALAJOUANINE

MM.

Clinique des maladies des enf.	DEBRE
Clinique des maladies infect.	MOLLARET
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale	DELAY
Clinique du diabète sucré et des maladies de la nutrition	BOULIN
Clinique Gynécologique	F. BRENTANO BARIETY J. BESANÇON MOREAU de GENNES
Cliniques Médicales	
Clinique méd. hydro-climat. thér.	DEBRAY
Clinique médicale propédeutique	PASTEUR V.-R. LANTUEJOUL VARANGOT LACOMME
Cliniques obstétricales	
Clinique ophtalmologique	VELTER
Clinique oto-rhino-laryngologique	AUBIN
Clinique psychiatrique infantile	HEUYER
Clinique rhumatologique	COSTE
Clinique stomatologique	DECHAUME
Clinique urologique	FEY
Embryologie	GIROUD
Génétique	LAMY
Histoire de la Méd. et de la Chir.	SOULIE
Histologie	VERNE
Hygiène et Clinique lère Enfance	CATHALA
Hygiène et Méd. Préventive	JOANNON
Médecine du Travail	DESOILLE
Médecine légale	PIEDELIEVRE
Parasitologie et hist. nat. méd.	GALLIARD
Pathologie chirurgicale	MENEGAUX
Pathologie exotique	LAVIER
Path. expérimentale et comparée	LENEGRE
Path. Hum. et Immun. exp.	MERKLEN
Pathologie médicale	DECOURT
Path. et Thérapeut. générales	GARCIN
Pédiatrie sociale	Julien MARIE
Pharmacologie et matière méd.	HAZARD
Physico-chimie méd. (ch. t. pers)	DOGNON
Physiologie	BINET
Physique médicale	STROHL
Problèmes alimentaires (c. t. pers)	RICHET
Radiologie médicale	IESGREZ
Technique chirurgicale	PATEL
Thérapeutique	TURPIN
Thérapeutique chirurgicale	SENEQUE
Thérapeutique médicale	LEMAIRE

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE MAITRES DE CONFERENCES — AGREGES ET AGREGES

	MM.		MM.
	(CABROL		(DUBOST
Anatomie	(DEBEYRE		(FAUREL
	(DELMAS		(FLABEAU
	(OLIVIER G.		(GERMAIN
	Melle GAU-		(GOSSET
Ana. Path.	(THIER V.	Pat. Chir.	(LAURENCE
	(BUSSER		(LORTAT-JACOB
	(GOUYGOU		(MATHEY
Bactério-}	(CHRISTOL		(OLIVIER (Cl)
logie }	(NEVOT		(POILLEUX
Biol. méd.	(BOURLIERE		(THOMERET
Chimie méd.	(ETTORI		(VERNE (J M)
Dermato-syphil.	(POLONOVSKI J	Pat. expé-	(MAURICE
Embryologie	(DUPERRAT	riment.	(LOEPER
	(TUCHMANN		(BOUVIER
	(BULLIARD		(BOUDIN
Histologie	(COUJARD		(BRICAIRE
	(N....		(BRISSAUD
Hydrologie	(CORNET		(CASTAIGNE
Hygiène	(BOYER		(CONTE
	(DEPARIS		(DEROT
Mal. infect.	(BASTIN		(DOMART
Médecine }	(DEROBERT	Pat. méd.	(LAMOTTE
légale et }	(GAULTIER		(LAROCHÉ
du Trav. }	(HADENGUE		(MACREZ
Neurochir.	(DAVID		(MILLIEZ
Neurologie	(LHERMITTE		(PEQUIGNOT
	(GRASSET		(PERRAULT
	(LE LORIER		(RAMBERT
	(LEPAGE		(ROYER
Obstétrique	(MERGER		(THIEFFRY
	(MORIN		(TURIAF
	(RAVINA		(WOLFRAMM
	(ROBEY		(JOSEPH
Ophtalmo-}	(BREGEAT	Pédiatrie	(POLONOVSKI Cl.
logie }	(DESVIGNES		(MOZZICONACCI
Orthopédie	(JUDET		(Melle LEVY
Oto-rhino-}	(AUBRY	Pharmacol.	(CHEYMOL
laryngo. }	(MADURO		(BARGETON
Parasito.	(BRUMPT		(DEJOURS
Parasito.col.	(CHABAUD	Physiol.	(PARROT
	(ABOULKER		(DJOURNO
Pat. chir.	(BARCAT	Physique	(GOUGEROT
	(BAUMANN	médicale	(KREIS
	(CAUCHOIX	Pneum. phthis.	

	MM.		MM.
Psychiatrie	{ BARUK PICHOT	Stomato	{ CHAPUT Mme CERNEA
Psych. infant.	MICHAUX	Urologie	KUSS
Rhumatologie	DELBARRE	Thérapeut.	CHASSAGNE

III.- PROFESSEURS HONORAIRES
et AGREGES RAPPELES à l'EXERCICE
pour le Service des Examens.

MM. GATELLIER, LE LORIER, VAUDESCAL.

IV.- PROFESSEURS SANS CHAIRE ET
AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE
A TITRE PERMANENT

	MM.		MM.
Clinique chir.	{ AMELINE HUGUIER LEGER PADOVANI ROUX	Urologie	COUVELAIRE
	{ RUDLER SICARD	Clinique mèl.	{ BROUET DREYFUS FAUVERT HAGUENAU HAMBURGER KOURILSKY MARCHAL SOULIE
	{ ECALLE MAYER		
	{ OFFRET		
	{ RENARD		
Clinique obstét.	{		
Clinique ophtal.	{		

Secrétaire de la Faculté M. MOREL
Secrétaire-Adjoint Melle CHAINTREUIL

Bibliothécaire en Chef	Dr HAHN
Conservateur	{ Melle GOICHON Melles DUMA-TRE LEF R MET QUIEVREUX
Bibliothécaires.	

Par délibération en date du 9 décembre 1798,
l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans
les dissertations qui lui seront présentées,
doivent être considérées comme propres à
leurs auteurs et qu'elle n'entend leur don-
ner aucune approbation ni improbation.

A mes Parents

A ma Soeur

A Monsieur le Professeur Max-Fernand JAYLE

Professeur de Biochimie Médicale à la
Faculté de Médecine de Paris
Officier de la Légion d'Honneur

Qui m'a fait le grand honneur
d'accepter la présidence de
cette thèse,

En hommage respectueux.

A Monsieur le Professeur Agrégé Jo NORDMANN

Qui, en m'accueillant dans son
laboratoire, m'a permis de
pénétrer dans le domaine de
la Biochimie,

Qui m'a guidée et encouragée
dans mon travail, avec tant
de bienveillance,

En témoignage de ma profonde
gratitude.

A Monsieur le Docteur Roger NORDMANN

Ancien Interne des Hôpitaux de Paris
Chef de Clinique à la Faculté de Médecine

Qui m'a aidée de ses conseils
et de son expérience, avec
tant d'amicale cordialité,

Qu'il trouve ici l'expression
de ma très vive reconnaissance.

A Madame Christiane NELIS

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

Qui a été la fidèle compagne de
toutes mes années d'études.

En témoignage de ma profonde
amitié.

A mes Maîtres des Hôpitaux de Paris

Les Professeurs Raoul BOULIN
Charles DEBRAY
Le Professeur Agrégé Maurice DEROT
Les Docteurs André RAVINA
Jean CANIVET
Maurice PESTEL

Médecins des Hôpitaux

Le Professeur Robert MERLE d'AUBIGNÉ
Le Professeur Agrégé Jean CAÛCHOIX

Chirurgiens des Hôpitaux

Le Professeur Agrégé Maurice AUBRY

Oto-Rhino-Laryngologiste des
Hôpitaux

Le Professeur Agrégé Jean RAVINA
Le Docteur René MUSSET

Gynécologues-Accoucheurs des Hôpitaux

MODIFICATIONS DE L'ELIMINATION URINAIRE
DES ACIDES DU CYCLE TRICARBOXYLIQUE
APRES CHARGE EN DL-MALATE CHEZ L'HOMME NORMAL

- : -

INTRODUCTION

-:-

L'existence du cycle tricarboxylique a été établie par de nombreux travaux. L'historique de cette découverte a été résumée par Krebs (1954) dans sa conférence de réception du prix Nobel.

Le cycle tricarboxylique est d'un intérêt capital au point de vue physiologique, car il occupe une position-clef dans le métabolisme intermédiaire. En effet, il est, d'une part, le donneur essentiel de l'énergie nécessaire aux synthèses endergoniques (Krebs, 1953). D'autre part, c'est à son niveau que se rejoignent les trois grands métabolismes, glucidique, lipidique et protidique. Enfin, certains de ses constituants sont utilisés en tant que matériaux dans la synthèse de nombreux composés dont le rôle physiologique est fondamental.

Cependant, la plupart des études ayant pour objet le cycle tricarboxylique, résultent de travaux expérimentaux réalisés *in vitro*. Quelques études ont été réalisées également *in vivo* chez l'animal entier (Krebs, Salvin et Johnson, 1938 ; Busch et Potter, 1952 ; Peters et coll., 1953).

Récemment, Nordmann et coll. (1955 c ; 1956) ont pu réaliser l'exploration du cycle tricarboxylique *in vivo* chez l'homme, en étudiant l'influence de charges en succinate de sodium

sur l'élimination urinaire des acides du cycle tricarboxylique, déterminée par chromatographie sur papier, par la technique de Nordmann et coll. (1954, a, b, c ; 1955 a ; 1956).

Nous nous sommes donné pour but d'étudier, par la même méthode, l'influence, chez l'homme normal, de charges en malate de sodium sur l'élimination urinaire des acides du cycle tricarboxylique. L'acide malique, en effet, occupe dans le cycle une position particulièrement intéressante, puisqu'il peut être métabolisé par différents processus : par exemple, si l'oxaloacétate qui en résulte peut se condenser avec l'acétate actif pour donner du citrate, il peut aussi se transaminer avec le glutamate pour donner lieu à la formation d'aspartate et d' α -céto-glutarate (Figure 1).

Diagram illustrating the metabolic pathways of the Citric Acid Cycle (Krebs Cycle) and its connection to Glycolysis and Gluconeogenesis.

Glucose Entry: GLUCOSE is converted to Pyruvate ($\text{CH}_3\text{-CO-COOH}$) via Glycolyse.

Pyruvate Entry: Pyruvate ($\text{CH}_3\text{-CO-COOH}$) is converted to Acetyl-CoA ($\text{CH}_3\text{-CO-S-CoA}$) via Acetyl-coenzyme A, releasing CO_2 and 2H^+ .

Acetyl-CoA Entry: Acetyl-CoA ($\text{CH}_3\text{-CO-S-CoA}$) enters the Citric Acid Cycle.

Citric Acid Cycle Pathway:

- Acetyl-CoA ($\text{CH}_3\text{-CO-S-CoA}$) + Oxaloacetic acid (Ac. Oxaloacétique) $\rightarrow$ Citrate ($\text{CH}_2\text{-COOH-CH(OH)-COOH}$) + CoA-SH.
- Citrate ($\text{CH}_2\text{-COOH-CH(OH)-COOH}$) $\rightarrow$ Isocitrate (Ac. Isocitrique) + H_2O .
- Isocitrate (Ac. Isocitrique) $\rightarrow$ α -Ketoglutarate ($\alpha\text{-Cétoglutarique}$) + CO_2 and 2H^+ .
- α -Ketoglutarate ($\alpha\text{-Cétoglutarique}$) + CoA-SH $\rightarrow$ Succinyl-CoA ($\text{Succinyl-Coenzyme A}$) + H_2O .
- Succinyl-CoA ($\text{Succinyl-Coenzyme A}$) $\rightarrow$ Succinate (Ac. Succinique) + CoA-SH.
- Succinate (Ac. Succinique) + H_2O $\rightarrow$ Malate (Ac. Malique) + 2H^+ .
- Malate (Ac. Malique) $\rightarrow$ Oxaloacetic acid (Ac. Oxaloacétique) + CoA-SH.

Transamination: Oxaloacetic acid (Ac. Oxaloacétique) can be converted to Aspartate (Ac. Aspartique) via TRANSAMINATION, which then enters the Glycolyse pathway.

Schéma du cycle tricarboxylique

Des expériences de charge par l'acide malique ou le malate de sodium avaient déjà été pratiquées antérieurement, chez l'animal.

Ainsi, dès 1937, Orten et Smith avaient étudié les variations de l'excrétion de l'acide citrique, après administration par voie veineuse chez le chien, de dl-malate de sodium (100 mg de sodium par kg de poids) et avaient noté, après une telle charge, une forte élévation de la citraturie (plus de 30 fois l'élimination des animaux témoins), précoce et peu durable. De plus, en diminuant de moitié la dose de dl-malate injectée, ces auteurs avaient constaté que la quantité de citrate retrouvée dans les urines était diminuée de moitié.

D'autre part, Simola et Krusius (1939, 1940) ont étudié chez le rat les modifications du taux de l'acide citrique et de l'acide α -céto-glutarique des urines, sous l'influence de diverses charges per-orales, parmi lesquelles figurent les charges en malate. Celles-ci font apparaître une élimination accrue des deux acides étudiés, nettement supérieure à l'action alcalinisante, tandis que, dans les mêmes conditions, on n'observe que peu de modifications de l'élimination des acides pyruvique et lactique, ainsi que des corps cétoniques.

Enfin, Krebs, Salvin et Johnson (1938) ont étudié l'influence de charges en acide l-malique sur l'élimination urinaire des acides citrique, α céto-glutarique et succinique. Ces charges ont été réalisées chez le lapin (par voie veineuse) et chez le rat (par voie sous-

cutanée). Krebs et coll. ont pu constater ainsi, chez le lapin, une élévation relativement importante de l'élimination urinaire des acides citrique et α céto-glutarique, après perfusion lente de $20.000 \mu M$ d'acide l-malique partiellement neutralisé ; la somme des acides considérés représente alors 3,5 % de l'acide injecté. Le taux du succinate urinaire, par contre, reste pratiquement inchangé dans ces conditions.

Bien que ce travail soit d'un intérêt indiscutable, il faut noter qu'il s'agit là d'une expérience unique, réalisée sur un seul animal, et concernant l'étude de l'élimination de trois des acides du cycle seulement. De plus, le fait que les chiffres d'élimination de base des acides α céto-glutarique et succinique se situent entre des limites très étendues (2 à $59 \mu M$ par 24 heures pour l'acide succinique) autorise à penser que les méthodes utilisées alors pour la détermination de ces acides, manquaient de précision.

Enfin, toutes ces études ont été réalisées sur l'animal. Aucune d'entre elles ne concerne le sort de l'acide malique ou du malate chez l'homme.

PARTIE EXPERIMENTALE

- :-

I.- REALISATION PRATIQUE DES CHARGES EN MALATE CHEZ L'HOMME

-:-

Nous avons réalisé les charges en malate chez l'homme, en perfusant par voie veineuse, 1 mM de dl-malate de sodium par kg de poids, en solution dans 250 cm³ d'eau distillée, à raison de 0,033 mM par kg de poids et par minute. Le malate de sodium est stable et peut être soumis à la stérilisation.

Les urines sont recueillies aussitôt avant le début de la perfusion et aussitôt après la fin de celle-ci, de même que 90 minutes, 3 heures, 6 heures et 12 heures après la fin de la perfusion. On note chaque fois le volume de l'urine, et l'on en conserve un échantillon à 4° C, en présence d'un antiseptique (solution à 1 ‰ de Merseptyl : 0,1 cm³ pour 10 cm³ d'urine).

Les perfusions de malate ont toujours été parfaitement tolérées. Aucune action cardio-vasculaire, en particulier, n'a été notée au cours de ces perfusions, malgré l'action dépressive du malate sur le coeur isolé de grenouille (Salant et coll., 1917).

-:-

II.- TECHNIQUES DE DOSAGES ET RESULTATS

-:-

CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE

SUR PAPIER

DES ACIDES STABLES

DU CYCLE TRICARBOXYLIQUE

La chromatographie quantitative sur papier des acides organiques des urines - technique mise au point par Nordmann et coll. (1955 a ; 1956) - donne la possibilité de déterminer en une seule expérience quatre des acides stables du cycle tricarboxylique : les acides aconitique, succinique, fumarique et malique. C'est pour cette raison, et aussi pour sa grande sensibilité, que nous avons choisi cette méthode.

Cependant, à côté de ses avantages, cette technique présente certaines difficultés (Nordmann et coll., 1954 a,b,c ; 1956). Ainsi, avant chromatographie de l'urine, il faut en éliminer certaines substances interférentes (anions minéraux, ampholytes, cations, substances non ionisées), pouvant masquer les spots correspondant aux acides du cycle. L'élimination de ces substances doit pouvoir être effectuée sans qu'il y ait des pertes d'acides organiques.

D'autre part, l'interprétation des chromatogrammes est souvent rendue difficile du fait de l'absence de techniques de révélation permettant

de caractériser les acides organiques non aminés, et encore moins, de caractériser de façon sélective les acides du cycle tricarboxylique.

°°°

I.- Elimination des substances interférentes.

Cette élimination est réalisée grâce aux résines d'échange ionique, qui nous ont donné des résultats plus satisfaisants que la désalification électrolytique ou l'extraction continue des acides organiques par l'éther, techniques que nous avons essayées tout d'abord. Il est préférable de n'utiliser qu'une résine d'échange anionique pour l'élimination des substances interférentes de l'urine, car l'utilisation de résines d'échange cationique peut donner lieu à des phénomènes d'adsorption non ionique de certains acides organiques (Nordmann et coll., 1954 a et b).

- Principe

On fait passer le liquide à étudier à travers une colonne contenant une résine d'échange anionique dans le cycle formiate. Au cours de ce passage, la totalité des anions contenus dans le liquide est fixée sur la résine (qui libère parallèlement des ions formiate) tandis que les substances non ionisées, les cations et les ampholytes passent dans l'effluent qui est rejeté.

Au cours du second temps de l'opération, on réalise l'élution des acides fixés sur la résine, au moyen d'acide formique. Il est impossible d'éluer la totalité des acides organiques sans élution simultanée d'une partie des acides minéraux, ainsi que nous l'ont montré des essais effectués avec divers types de résines et différentes concentrations d'acide formique

(Nordmann et coll., 1954, b). En utilisant une résine fortement basique (Dowex 2), avec élution par l'acide formique 12 N (Nordmann et coll., 1955, a), l'éluat contient, en fait d'acides minéraux, l'essentiel des phosphates, une fraction importante des sulfates et de petites quantités de chlorures. Ces anions minéraux ne gênent pas la chromatographie sur papier des acides organiques, à l'exception de l'acide citrique, qui, pour cette raison, doit être déterminé par une autre méthode.

Au cours du dernier temps de l'opération, l'éluat est concentré par élimination de l'acide formique utilisé pour l'élution, et le résidu ainsi obtenu est soumis à la chromatographie sur papier.

- Réalisation pratique

a) Préparation des colonnes de résine

Nous utilisons des colonnes de résine Dowex 2 de 40 mm de hauteur et de 4 mm de diamètre, le diamètre des particules de résine étant de 150 à 200 mesh. La résine est contenue dans la tige de petites ampoules à décanter, fermées, en bas par un robinet, et en haut, par un bouchon de verre rodé. La régularité de répartition des particules de résine, et surtout, l'absence de contact de celle-ci avec l'air, sont parmi les conditions essentielles à observer pour obtenir des résultats satisfaisants et reproductibles (Nordmann et coll., 1954 d).

Avant d'utiliser la résine, il faut en éliminer les impuretés, ce qui est réalisé selon le procédé recommandé par Samuelson (1952), par passage à trois reprises de 5 cm³ d'acide chlorhydrique N, 25 cm³ d'eau, 5 cm³ de soude 0,5 N et 25 cm³ d'eau sur chaque colonne.

La résine est alors transférée dans le cycle formiate, par passage de 50 cm³ de formiate de sodium M, suivis de 250 cm³ d'eau.

b) Passage de l'échantillon d'urine

La teneur des urines en créatinine est prise comme base de référence pour minimiser l'influence des variations de dilution de l'urine. On fait ainsi passer sur la résine un volume d'urine contenant une quantité déterminée de créatinine (2 mg dans la plupart des cas ; lorsque la teneur en acides organiques est supposée élevée, par exemple pour les urines recueillies au cours des charges en un des acides du cycle, cette quantité est réduite à 1 mg et à 0,5 mg si l'on ajoute à l'urine des acides-témoins). La créatinine est dosée selon la technique d'Owen et coll. (1954).

On fait passer sur la résine (à raison de 0,4 cm³ par minute) le volume d'urine ainsi déterminé, suivi de 15 cm³ d'eau. L'effluent de la colonne est rejeté.

c) Elution des anions fixés par la résine

Cette élution est effectuée par passage sur la résine de 10 cm³ d'acide formique 12 N.

d) Concentration de l'éluat

L'éluat recueilli au sortir de la colonne est alors concentré par évaporation de l'acide formique dans une étuve à 40°C, en présence d'un mélange de soude et de chlorure de calcium (1 partie de soude en écailles pour 2 parties de chlorure de calcium). Le résidu ainsi obtenu est alors chromatographié en deux dimensions, tandis que la régénération de la colonne de résine est assurée par passage de 30 cm³ de formiate de sodium 3 M, suivis de 100 cm³ d'eau.

II.- Technique chromatographique

La chromatographie en deux dimensions (indispensable pour assurer la séparation des nombreux acides organiques de l'urine) est réalisée sur papier Arches 302 lavé (selon le procédé indiqué plus loin), en utilisant successivement un solvant alcalin et un solvant acide. Le solvant alcalin utilisé pour la première dimension est composé de : alcool éthylique absolu, ammoniacque 22° Baumé (soit 21,6 % NH_3), eau (80/15/5). Le solvant acide utilisé pour la deuxième dimension perpendiculaire à la première, a été préconisé par Cheftel, Munier et Macheboeuf (1951). Il est composé de : alcool propylique normal, eucalyptol, acide formique 98 % (500/500/200). On ajoute la quantité d'eau suffisante pour obtenir le premier trouble persistant après agitation. On laisse reposer pendant 48 heures. La phase inférieure (eau) est éliminée, et la phase supérieure est alors prête à être utilisée pour la chromatographie.

Chaque développement est effectué par chromatographie ascendante pendant 14 à 16 heures à $24 \pm 1^\circ \text{C}$. Après chacun des développements, les chromatogrammes sont séchés pendant 4 heures à la température du laboratoire, en atmosphère ventilée. L'eucalyptol contenu dans le solvant acide favorise la volatilisation de l'acide du solvant lors du séchage du chromatogramme.

La révélation est alors effectuée, soit par un indicateur de pH (habituellement le vert de bromocrésol en solution alcoolique à 0,1 %), soit par une méthode de révélation différentielle.

III.- Interprétation des chromatogrammes

a) Identification des spots

L'identification des spots a été réalisée par plusieurs procédés :

- comparaison des R_f des spots à identifier avec ceux d'acides témoins chromatographiés dans les mêmes conditions,
- adjonction de témoins internes aux échantillons d'urines,
- révélations différentielles.

Certaines de ces révélations différentielles peuvent être utilisées successivement sur le même chromatogramme ce qui permet un gain de temps. Ainsi, il est possible de pulvériser le même chromatogramme, successivement avec une solution de ninhydrine (qui révèle les acides aminés), puis de vert de bromocrésol, puis enfin de para-nitraniline diazotée (qui met en évidence les acides hydroxybenzoïques sous forme d'un spot brun-rouge - Bray, Thorpe et White, 1950).

De même, on peut réaliser successivement la révélation du même chromatogramme par le vert de bromocrésol, puis par la para-diméthylaminobenzaldéhyde en solution dans l'anhydride acétique qui révèle sélectivement l'acide hippurique sous forme d'un spot orange (Gaffney et coll. 1954), et l'acide aconitique sous forme d'un spot rose (Nordmann, du Ruisseau et Nordmann, 1955, b), ainsi que l'acide citrique sous forme d'un spot rose pâle.

Ce sont là les révélations différentielles les plus utiles au cours de l'interprétation des chromatogrammes d'acides organiques des urines.

b) Interprétation quantitative

Les techniques les plus simples de chromatographie quantitative sur papier utilisent la relation qui unit la surface des spots et la quantité d'acide chromatographié. Selon les conditions, la surface des spots est proportionnelle soit à la quantité d'acide (Duncan et Porteous, 1953), soit au logarithme de cette quantité (Reid et Lederer, 1951; Bryant et Overell, 1953). Mais ces techniques supposent la chromatographie simultanée et sur le même chromatogramme d'acides témoins en quantités croissantes, dont la surface doit être comparée avec celle des acides à doser. C'est pourquoi ces techniques sont impossibles à appliquer à la chromatographie bidimensionnelle, indispensable à la séparation complète des nombreux acides organiques de l'urine. D'autre part, la présence d'anions minéraux modifie la surface des spots de certains acides organiques.

La technique colorimétrique d'Isherwood et Hanes (1953) présente le même inconvénient.

Nous avons donc eu recours à la titration des acides extraits des spots, selon la technique de Nordmann et coll. (1956), malgré les difficultés que présente cette méthode (Reid et Lederer, 1951). La titration est effectuée au pHmètre, sous azote, avec de la soude 0,1 N (Kolthoff et Laitinen, 1948, p. 109), après extraction des acides des spots par 10 cm³ d'éthanol à 20 %.

En raison des pertes survenant lorsqu'on emploie du papier non lavé, nous utilisons pour les chromatogrammes destinés à fournir des données quantitatives, le papier Schleicher et Schüll 2043 b, mgl (a), qui est lavé industriellement par les acides silicique et chlor-

hydrique, ou le papier Arches 302 que nous lavons par l'acide chlorhydrique 0,1 N. Ce papier donne de meilleurs résultats que le papier Whatman 1 lavé dans les mêmes conditions.

Les pertes chromatographiques, ainsi que les pertes survenant au cours de l'élimination des substances interférentes, sont établies en chromatographiant en même temps que chaque lot d'urines, des acides-témoins ainsi que ces mêmes acides passés sur colonne de Dowex 2, dans des conditions identiques à celles des urines. Tous les chromatogrammes sont faits en double. Enfin, de façon à obtenir un contrôle supplémentaire, chaque urine est chromatographiée, d'une part, sans adjonction de témoins, et d'autre part, après adjonction de 250 μ g de chacun des acides à déterminer quantitativement .

Cette technique permet, en particulier, la détermination quantitative de quatre des acides du cycle tricarboxylique, les acides aconitique, succinique, fumarique et malique. Elle n'est pas applicable à l'acide citrique, dont le spot, mal séparé, est souvent en continuité avec le spot des anions minéraux. C'est pourquoi cet acide doit être déterminé à part, par la méthode de Taylor (1953).

Enfin, en raison des pertes importantes survenant lors de la chromatographie de l'acide α céto-glutarique à l'état libre, cet acide est déterminé après transformation en sa 2-4 dinitrophénylhydrazone, par la technique chromatographique de El Hawary et Thompson (1953). Cette méthode permet également la détermination de l'acide oxalo-acétique dans les urines riches en cet acide.

RESULTATS

Ainsi qu'il a été décrit précédemment (Nordmann et coll., 1955 c ; 1956), six des acides du cycle tricarboxylique sont visibles sur les chromatogrammes ainsi réalisés, et quatre peuvent être déterminés quantitativement par cette méthode : les acides aconitique, succinique, fumarique et malique. De même qu'il avait été constaté par ces auteurs, lors des charges en succinate, l'apport de malate détermine un accroissement sélectif des spots correspondant aux acides du cycle. L'élimination des autres acides organiques de l'urine recueillie après charge en malate, ne subit pas de modifications notables, par rapport à l'urine recueillie avant charge. Cette augmentation de l'élimination urinaire des acides du cycle tricarboxylique ne peut pas être attribuée à une simple action alcalinisante de la perfusion de malate, car la perfusion d'une quantité équivalente de bicarbonate de sodium, réalisée dans les mêmes conditions, ne provoque pas cette augmentation sélective des acides du cycle, que l'on constate après charge en malate.

Nous avons déterminé quantitativement les acides aconitique, succinique, fumarique et malique, avant et après perfusion de dl-malate, chez six sujets normaux, de 55 à 75 kg.

L'élimination de malate dans l'urine des 24 heures suivant la perfusion, dépasse de 10 à 20 mM celle de l'urine de la veille. Par conséquent, si l'essentiel de l'acide administré n'est pas retrouvé dans l'urine, il y apparaît tout de même en quantité notable, puisqu'on retrouve dans les urines 13 à 18 % de la quantité injectée.

Pour préciser la chronologie du phénomène, nous avons dosé le malate urinaire chez ces

mêmes sujets, non seulement dans l'urine des 24 heures après charge, mais également dans des échantillons prélevés à différents moments au cours de ces 24 heures. Nous avons constaté, dans ces conditions, que le taux d'acide malique urinaire qui est de 0,5 mM par mg de créatinine dans l'urine avant charge, s'élève à 80 mM aussitôt après charge. Il n'est plus que de 48,5 mM, 90 minutes après la fin de la perfusion, et revient à 0,5 mM, 12 heures après.

On constate donc que l'élimination du malate est très précoce, puisque l'essentiel est éliminé peu après la charge.

Quant à l'élimination du succinate, elle est nettement augmentée par la charge en malate. En effet, étudié sur l'urine des 24 heures, suivant la charge en malate, on trouve en moyenne un excès de 0,28 mM d'acide succinique par rapport à l'urine de la veille. Cet excès résulte également d'une augmentation suivant de peu la charge, puisqu'on trouve, en moyenne, 0,25 mM d'acide succinique par mg de créatinine urinaire avant charge, 1,5 mM aussitôt après la fin de la perfusion et 1,4 mM 90 minutes après. Ce chiffre retombe à 0,25 mM, 12 heures après la fin de la charge.

Quant à l'élimination des acides aconitique et fumarique, elle est également augmentée précocement après charge, mais cette augmentation est trop faible pour pouvoir être estimée quantitativement avec suffisamment de précision.

DETERMINATION QUANTITATIVE DE L'ACIDE CITRIQUE

-:-

En dehors des méthodes basées sur la réaction de Furth et Hermann (1935), et de la technique chromatographique de H. Boser (1955), les méthodes de détermination de l'acide citrique sont basées sur la transformation de cet acide en un dérivé bromé, la pentabromoacétone (Stahre, 1895), évaluée ensuite par colorimétrie. Le grand nombre de ces méthodes, les modifications qui y sont apportées continuellement, rendent compte de leurs imperfections, comme des difficultés rencontrées au cours de leur exécution.

Quoi qu'il en soit des modalités d'exécution de chacune de ces méthodes, elles comprennent toutes deux étapes successives :

- La première étape est constituée par la formation de la pentabromoacétone. Pour cela, l'acide citrique, en milieu fortement acide, et sous l'action d'un oxydant, est décarboxylé et transformé en acide acétone-dicarboxylique. Celui-ci, en présence de brome, est rapidement transformé en pentabromo-acétone.

Ces réactions peuvent être représentées suivant un schéma proposé par Wiig et Pedersen

(1928, 1929, 1936 ; Gey , 1953) (fig. 2).

La pentabromoacétone ainsi constituée est extraite du milieu acide où elle se trouve en solution, par un solvant approprié, et, au cours de la deuxième étape de la détermination, est évaluée par colorimétrie.

Au cours de ces deux étapes, les différentes méthodes se distinguent aussi bien par les conditions de réaction que par les réactifs employés, et l'accord est loin d'être fait sur les unes et les autres.

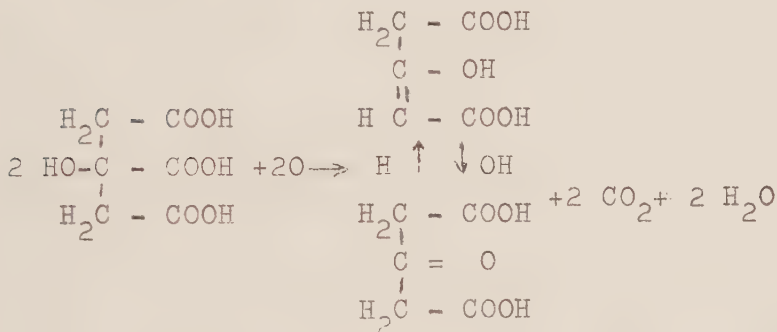
Les oxydants les plus employés actuellement sont le permanganate de potassium (Natelson, Lugovoy et Pincus, 1947 ; Gey, 1953) et le métavanadate d'ammonium ou de sodium (Weil-Malherbe et Bone, 1949 ; Taylor, 1953 ; McArdle, 1955), dont l'utilisation a été suggérée par Pozzi-Escot (1946). Cet auteur avait constaté que l'acide vanadique, à l'état de traces, catalysait l'oxydation de l'acide citrique en acide acétone-dicarboxylique par le chlorate. Le rôle du chlorate dans cette réaction, est, vraisemblablement, de réoxyder l'ion vanadyl réduit. Dans ces conditions, l'on pouvait s'attendre à ce que l'oxydation se produise en présence d'une quantité suffisante de vanadate, mais en l'absence de chlorate. C'est là ce qui se produit en réalité (Weil-Malherbe et Bone, 1949).

En ce qui concerne l'oxydation par le permanganate, les conditions de réaction sont discutées ; et parmi les auteurs usant de cet oxydant, les uns recommandent d'éviter tout excès de permanganate, les autres d'agir, au contraire, en présence d'un excès de permanganate.

L'accord n'est pas réalisé non plus sur la concentration optima du milieu en acide. Suivant les auteurs, la concentration optima varie de 1,5 N à 16,5 N en acide sulfurique. Selon McArdle (1955), la sensibilité de la méthode

Figure 2

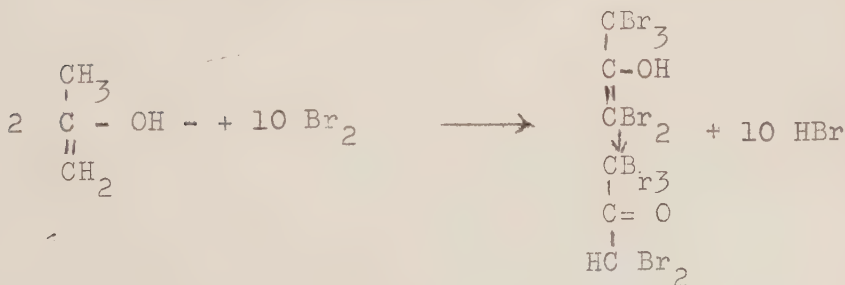
I.- Oxydation et décarboxylation de l'acide citrique



II.- Décarboxylation spontanée (ou oxydative) de l'acide acétone-dicarboxylique exclusivement sous sa forme cétonique.



III.- Bromuration de l'acétone, sous sa forme énolique, réaction se plaçant aussitôt après la décarboxylation de l'acide acétone-dicarboxylique.



augmente parallèlement à l'augmentation de l'acidité du milieu, et l'optimum est atteint pour une concentration en acide sulfurique de 16,5 N. Au-dessus de 17 N, on voit survenir au contraire, une diminution de la sensibilité.

Selon Gey (1953), il n'est indispensable d'agir en milieu fortement acide, que si l'on utilise ensuite des réducteurs violents pour éliminer l'excès de brome et d'oxydant, et c'est là, selon cet auteur, une des phases les plus critiques de la détermination. Gey prescrit l'usage de réducteurs tels que l'hydrazine, l'hyposulfite ou le nitrite de sodium, qui, en présence d'oxydants, sont capables de détruire une partie de la pentabromoacétone formée, et ceci dans des proportions absolument incontrôlables. Ce même auteur désapprouve aussi l'utilisation de sulfate ferreux qui, selon Taylor (1953), ne présenterait pas les mêmes inconvénients que l'hyposulfite, et ceci, même s'il est en excès. D'après Gey (1953), l'excès de sulfate ferreux, impossible à éviter en raison de la coloration propre de ses solutions, peut donner lieu à des interférences dans la coloration finale, si l'on n'élimine pas ensuite, par un lavage, les moindres traces de sulfate ferreux qui auraient pu demeurer dans la solution de pentabromoacétone.

En raison de tous ces inconvénients, Gey recommande l'usage d'eau oxygénée à 3 %, pour éliminer l'excès de brome et de permanganate, en évitant tout excès d'eau oxygénée.

Quel que soit le moyen utilisé pour éliminer l'excès de brome, tous les auteurs insistent sur le fait que cette élimination doit être complète, car il ne doit pas persister au-delà de ce stade, la moindre trace de brome.

Le temps suivant de la détermination consiste

à extraire, par un solvant approprié, la pentabromoacétone du milieu acide où elle se trouve en solution. La plupart des auteurs utilisent pour cela de l'éther de pétrole à point d'ébullition élevé (80 - 105° C), ou de l'heptane (Ettinger, Goldbaum et Smith, 1952). D'après Gey (1953), on peut aussi utiliser de l'éther de pétrole à point d'ébullition plus bas.

Quel que soit le solvant employé, il importe qu'aucune trace de brome n'y pénètre au cours de l'extraction de la pentabromoacétone, c'est pourquoi il est fondamental d'éliminer au cours du temps précédent, tout l'excès de brome.

C'est sur la pentabromoacétone en solution dans l'éther de pétrole, que se fait la dernière partie de la détermination, c'est-à-dire la coloration qui permet l'évaluation quantitative de l'acide citrique. Mais, avant d'arriver à cette dernière opération, il importe d'éliminer rigoureusement les moindres traces d'acide qui pourraient contaminer la solution. Cette élimination peut être réalisée en ajoutant à la solution une petite quantité de sulfate de sodium anhydre, ou en lavant l'éther de pétrole par de l'eau distillée, ou, encore, en combinant ces deux procédés (McArdle, 1955). Gey (1953), propose de laver l'éther de pétrole avec de l'eau distillée, puis avec du tampon-phosphate pH = 7,0.

La solution étant rigoureusement neutre, on peut alors procéder à l'évaluation colorimétrique de la pentabromoacétone en solution dans l'éther de pétrole. Cette détermination peut être réalisée par différents procédés, sur les mérites et les inconvénients desquels l'accord n'est pas toujours réalisé entre les auteurs des différentes méthodes :

- 1) La pentabromoacétone donne lieu, en présence de monosulfure de sodium, à la forma-

tion d'une coloration jaune dont on peut évaluer l'intensité au spectrophotomètre (Weil-Malherbe et Bone, 1949 ; Taylor, 1953).

Pour Gey (1953), le monosulfure de sodium agit en libérant le brome en combinaison dans la pentabromoacétone. Le brome en solution aqueuse, est alors évalué photométriquement.

2) En présence d'iodure en solution alcoolique, le brome de la pentabromoacétone est progressivement remplacé par l'iode. L'iode substitué est cependant libéré, et peut être évalué photométriquement en tant qu'iode moléculaire. (Kometiani, 1931 ; Taussky et Shorr, 1947).

3) La pentabromoacétone forme avec la thiourée, un complexe coloré en jaune en milieu alcalin.

4) Une autre méthode, enfin, est basée sur la coloration rouge que donne la pentabromoacétone en présence de pyridine, en milieu alcalin (Ettinger, Goldbaum et Smith, 1952).

Par comparaison des extinctions données par ces différents procédés, Gey (1953) a trouvé, pour la méthode à l'iode (évalué dans l'ultraviolet), une extinction 60 fois supérieure à celle donnée par la méthode au monosulfure, et, pour la méthode basée sur la formation du complexe thiourée-pentabromoacétone, une extinction 3,5 fois supérieure à celle de la méthode au monosulfure, ceci pour une concentration de $3,47 \cdot 10^{-5}$ mol. de pentabromoacétone dans la solution colorée.

Il ressort du travail de Gey (1953) que, indiscutablement, la méthode à l'iode est, de très loin, supérieure aux autres du point de vue de la sensibilité : elle permet d'évaluer

des quantités de l'ordre de 0,1 μ g. Mais elle ne donne de résultats cohérents et reproductibles que dans certaines conditions de réactions bien définies ; en particulier, il est indispensable de standardiser la concentration en ions H^+ , la température, l'intensité de l'éclairement, et le temps de réaction. De plus, certains composés, tels que l'acide 3 hydroxybutyrique, sont susceptibles, dans ces conditions, de donner lieu à des interférences.

La méthode utilisant le monosulfure de sodium présente beaucoup d'inconvénients, outre l'extinction relativement faible que donne cette coloration. Les cristaux de monosulfure de sodium s'altèrent facilement, et il est indispensable d'éliminer les impuretés pouvant se trouver à leur surface et être à l'origine de résultats irréguliers (MacArdle, 1955). Cette coloration, d'autre part, est sensible à la lumière, de même qu'aux variations de température (Weil-Malherbe et Bone, 1949). C'est pour quoi il est indispensable de standardiser la température à 18°C, pour obtenir des résultats reproductibles. Enfin, il ne faut pas prolonger le temps d'extraction de la pentabromoacétone par le monosulfure, pendant plus d'une minute, car, dans ce cas, on voit survenir une diminution de l'intensité de la coloration (Weil-Malherbe et Bone, 1949).

Taylor (1953) recommande de faire les lectures au spectrophotomètre, entre 15 et 30 minutes après la fin de l'extraction, la coloration atteignant son maximum à ce stade.

Gey (1953) préconise l'utilisation d'une solution de thiourée et borate de sodium. Cette méthode, d'après lui, est supérieure à la précédente, non seulement du point de vue de la sensibilité, mais aussi du point de vue de la spécificité.

Enfin, McArdle (1955), utilise un mélange de thiourée, borate de sodium et monosulfure de sodium, donnant une coloration jaune-orangé, ayant son maximum d'absorption à 435, avec un pic secondaire entre 460 et 500. Cette coloration, stable pendant 3 heures, n'est pas affectée par les variations de température entre 15 et 30° C, et donne une extinction plus élevée que celles données par le monosulfure seul ou le mélange thiourée-borate seul (McArdle, 1955).

°°

Méthode utilisée au cours de nos expériences.

La méthode que nous avons utilisée pour la plupart des déterminations d'acide citrique, est inspirée de celle qui a été décrite par Taylor (1953).

Les urines, éventuellement déprotéinisées par l'acide trichloracétique (10 % p/v) sont diluées au 1/5 avec de l'acide sulfurique normal, ou au 1/10, si ces urines sont supposées contenir de fortes quantités d'acide citrique. On met en expérience 5 cm³ de l'une ou l'autre de ces dilutions, soit 1 cm³ ou 0,5 cm³ d'urine.

On effectue parallèlement tous les temps de la méthode sur des quantités connues d'acide citrique, en solution dans l'acide sulfurique normal.

Les échantillons à étudier sont placés dans des tubes de pyrex à bouchons rodés, et additionnés de 5 cm³ d'acide sulfurique 27 N. Après avoir laissé reposer 10 minutes, on ajoute 5 cm³ d'un mélange de bromure de potassium

(19,836 g/litre), bromate de potassium (5,440 g/litre) et métavanadate d'ammonium (12 g / litre) en solution dans l'eau.

Après avoir retourné les tubes plusieurs fois, on les place dans un bain-marie à 50°C, pendant 20 minutes. Après refroidissement à la température ambiante, on ajoute 2 cm³ d'une solution de sulfate ferreux fraîchement préparée (22 % p/v, dans l'acide sulfurique normal). Les tubes sont alors retournés plusieurs fois, de façon à éliminer toutes les traces de brome pouvant adhérer aux parois. Pour être plus sûr de l'élimination complète de tout l'excès de brome, Taylor (1953), recommande d'attendre au moins 10 minutes avant de passer au temps suivant. Celui-ci consiste à ajouter 7 cm³ d'heptane et à agiter mécaniquement pendant 2 à 3 minutes, pour extraire la pentabromoacétone de la phase aqueuse où elle se trouve en solution, et la faire passer dans la phase heptane. Après cette extraction, la plus grande quantité possible d'heptane est aspirée avec une pipette et introduite dans un tube à centrifuger contenant une pincée de sulfate de sodium anhydre, et centrifugée 5 minutes, à grande vitesse.

5 cm³ de cet heptane sont alors repris et introduits dans un autre tube à bouchon rodé. Après adjonction de 3 cm³ d'une solution de monosulfure de sodium à 2 % (p/v), fraîchement préparée et refroidie dans la glace, les tubes sont agités mécaniquement pendant une minute exactement. La phase inférieure, maintenant colorée en jaune, est aspirée et introduite dans les cuves du spectrophotomètre. La lecture des colorations est faite (à une longueur d'onde de 450 mμ) entre 15 et 30 minutes après la fin de l'extraction. Il importe de protéger les tubes de la lumière et d'opérer à 18°C, la coloration étant sensible à la lumière et à la chaleur.

Avant de préparer la solution de monosulfure de sodium, il est indispensable de rincer et de sécher les cristaux pour éliminer les impuretés (thiosulfate, en particulier); pouvant se trouver à leur surface, et être à l'origine de résultats irréguliers dans les lectures (McArdle, 1955).

A partir des lectures faites pour les solutions pures d'acide citrique, on construit la courbe des densités optiques en fonction des concentrations en acide citrique. Cette courbe est une droite, passant par l'origine. En reportant sur cette droite les valeurs trouvées pour les échantillons inconnus, on obtient directement la concentration en acide citrique dans l'échantillon soumis à la détermination.

Si l'on a des raisons de soupçonner la présence dans les urines de composés aromatiques, en particulier de dérivés salicylés, il est indispensable de les éliminer par une bromuration préalable à la détermination de l'acide citrique. La présence de ces composés donne lieu à des lectures très fortes, faisant croire à des concentrations en acide citrique beaucoup plus importantes que celles qui existent en réalité dans les échantillons étudiés, et constitue par là, une source importante d'erreurs.

°°°

D'après McArdle (1955), il semble que cette méthode ne soit pas sans défauts. Selon cet auteur, la sensibilité augmente avec la concentration du milieu en acide sulfurique, au cours de la première étape de la détermination, jusqu'à une concentration de 16,5 N, pour diminuer au-delà de 17 N. C'est pourquoi cet auteur propose l'utilisation d'acide sulfurique 33 N,

alors que l'acide sulfurique 27 N, utilisé par Taylor (1953) ne permet pas d'atteindre une concentration assez forte pour obtenir l'acidité optima.

D'autre part, plusieurs auteurs (Gey, 1953 ; McArdle, 1955) s'accordent à dire qu'il est indispensable de laver l'heptane pour en éliminer plus sûrement toute trace d'acide avant de passer à la coloration finale. De plus, d'après Gey (1953), les traces de sulfate ferreux qui pourraient contaminer l'heptane, risquent aussi de donner lieu à des causes d'erreurs au cours de la coloration finale. C'est pourquoi, dans une méthode utilisant le sulfate ferreux, on a deux raisons de laver l'heptane, d'une part, pour éliminer les traces d'acide, d'autre part, pour se débarrasser de l'excès de sulfate ferreux.

Enfin, en ce qui concerne la coloration finale, il semble logique de préférer au monosulfure de sodium seul, le mélange de thiourée (4 %), borate de sodium (2 %), monosulfure de sodium (0,2 %), proposé par McArdle (1955), donnant une coloration stable pendant 3 heures, non affectée par la lumière ni par les variations de température entre 15 et 30°C (McArdle, 1955).

C'est pour toutes ces raisons que nous employons désormais la méthode de McArdle (1955) de préférence à celle de Taylor (1953). Cependant, des expériences de comparaison de ces deux méthodes, faites sur des plasmas normaux, nous ont montré que la récupération de l'acide citrique ajouté aux échantillons de plasma, est également bonne par l'une et l'autre de ces méthodes.

Nous n'avons que très peu d'expérience de la méthode au permanganate de Gey (1953). Les

résultats que nous avons obtenus par cette méthode, pour des solutions pures d'acide citrique, paraissent très bons ; mais cette technique est beaucoup plus délicate à exécuter que les autres, et c'est là, semble-t-il, son inconvénient majeur.

°°°

RESULTATS

Nous avons constaté que l'élimination de l'acide citrique dans l'urine des 24 heures suivant la charge en malate s'élève en moyenne de 0,9 mM, par rapport à l'élimination dans l'urine des 24 heures précédant la charge.

D'autre part, l'étude d'échantillons d'urines fractionnés, recueillis à différents intervalles au cours des 24 heures suivant une telle charge, nous a permis de suivre avec plus de précision les modifications de la citraturie apportées par la charge en malate.

Avant charge, l'élimination de l'acide citrique est, en moyenne, de 1,85 mM par mg de créatinine urinaire. Aussitôt après la fin de la perfusion, ce taux s'élève à 3,75 mM de citrate par mg de créatinine urinaire. 90 minutes plus tard, la citraturie est encore plus élevée et atteint 5,75 mM par mg de créatinine, alors que 12 heures après charge, elle n'est plus que de 1,9 mM par mg de créatinine urinaire.

Ces chiffres correspondent à la moyenne des valeurs trouvées pour 6 sujets normaux, de 55 à 75 kg.

DETERMINATION QUANTITATIVE
DE L'ACIDE α CETO - GLUTARIQUE

La détermination quantitative de l'acide α céto-glutarique n'est pas réalisable par la méthode de chromatographie sur papier utilisée pour les autres acides du cycle tricarboxylique (Nordmann et coll., 1955, a, 1956).

En effet, lorsqu'on essaie de chromatographier de l'acide α céto-glutarique sous forme d'acide libre, on voit survenir des pertes importantes. C'est pourquoi nous faisons la détermination quantitative de cet acide sous forme de sa 2-4 dinitrophénylhydrazone, par la méthode chromatographique de El Hawary et Thompson (1953).

- Principe

Basée sur le travail initial de Dakin et Dudley (1913), la détermination des acides cétoniques sous forme de leurs hydrazones a été introduite par Barrenscheen et Dreguss (1931), et a été modifiée depuis par de nombreux auteurs, parmi lesquels on peut citer Peters et Thompson (1934), Lu (1939 a), Bueding et Wortis (1933), Friedemann et Haugen (1943).

C'est en 1949 que Cavallini, Frontali et Toschi ont réalisé la séparation et l'évaluation

des hydrazones des acides cétoniques par chromatographie sur papier (Cavallini et coll. 1949 a). Ces mêmes auteurs ont appliqué leur méthode à la détermination quantitative des acides pyruvique et α céto-glutarique du sang et des urines (Cavallini , Frontali et Toschi, 1949 b).

Méthode utilisée (El Hawary et Thompson, 1953).

Les hydrazones des acides cétoniques des urines sont extraites par l'acétate d'éthyle et le résidu obtenu après évaporation du solvant est soumis à la chromatographie sur papier qui permet de séparer les hydrazones des différents acides cétoniques présents dans l'échantillon d'urine. Après élution de la tache colorée correspondant à l'hydrazone de l'acide α céto-glutarique, la quantité d'hydrazone est évaluée par colorimétrie.

Réalisation pratique

1) Formation des hydrazones

L'échantillon d'urine à étudier est dilué avec de l'eau distillée, de façon à obtenir un volume final de 20 cm³. D'une façon générale, le volume initial d'urine utilisé est de 2 cm³, mais l'on peut être amené à réduire ce volume à 1 cm³ ou même 0,5 cm³ si l'urine à étudier est supposée contenir de fortes quantités d'acides cétoniques.

A l'urine ainsi diluée, on ajoute 2 cm³ d'une solution à 92 % de 2-4 dinitrophénylhydrazine, dans l'acide chlorhydrique 2 N. Une incubation de 20 minutes à 38°C assure la formation des 2-4 dinitrophénylhydrazones des acides cétoniques, qui peuvent être conservés quelques jours sous cette forme, à 4°C. Par contre, il est es-

essentiel de transformer les acides cétoniques en leurs hydrazones le plus rapidement possible après la collecte de l'échantillon, même si, momentanément, on ne peut pas poursuivre plus loin l'exécution de la méthode. En effet, si les hydrazones peuvent être conservés quelques jours à 4°C, il n'en va pas de même pour les acides cétoniques sous forme de leurs sels, tels qu'ils se trouvent dans l'urine, même si celle-ci est conservée à 4°C. Des déterminations faites à plusieurs jours d'intervalles sur la même urine nous ont montré que l'on voyait survenir une baisse du taux de l'acide α céto-glutarique, même dans les échantillons conservés à 4°C, alors qu'on n'observe pas de pertes en conservant les hydrazones dans les mêmes conditions.

2) Extraction des hydrazones

Les hydrazones ainsi formées sont extraites par agitation de la solution avec 10 cm³ d'acétate d'éthyle. Après centrifugation à 4000 tours minute pendant 20 minutes, les deux phases sont nettement distinctes et la phase supérieure est prélevée aussi complètement que possible à l'aide d'une pipette Pasteur très effilée. On répète l'extraction avec 5 cm³ d'acétate d'éthyle, ceci trois fois de suite, en centrifugeant 10 minutes entre chaque extraction. L'acétate d'éthyle, coloré en jaune, est prélevé chaque fois à l'aide de la pipette Pasteur, et toutes les portions ainsi prélevées sont réunies dans une ampoule à décanter.

Il arrive qu'après centrifugation, il demeure à la limite de séparation des deux phases une couche de flocons jaunâtres. Il ne faut pas prélever ces flocons avec l'acétate d'éthyle, mais les laisser avec la phase inférieure, même s'ils restent colorés après la dernière extraction.

L'acétate d'éthyle contenu dans l'ampoule à

décanter est agité 4 fois de suite avec 2 cm³ d'une solution de carbonate de sodium à 10 %. Les 4 fractions de 2 cm³ de carbonate de sodium sont réunies et agitées avec 2 cm³ d'acétate d'éthyle, pour éliminer l'excès de 2-4 dinitro-phénylhydrazine. Après avoir refroidi la solution, on y ajoute goutte à goutte de l'acide chlorhydrique concentré, refroidi (0 à 4°C), ceci jusqu'à ce que l'on n'observe plus de dégagement gazeux. Il faut absolument éviter de rester en milieu alcalin. La solution ainsi traitée est alors agitée 4 fois de suite dans une ampoule à decanter, avec 2 cm³ d'acétate d'éthyle. Il faut noter que l'on est souvent amené à multiplier le nombre des extractions, et ceci tout au long de la technique, en raison de la forte concentration de certaines urines en acide α céto-glutarique (en particulier, les urines recueillies aussitôt après charge en malate).

On réunit les portions d'acétate d'éthyle résultant de cette dernière extraction et contenant maintenant les hydrazones en solution. L'acétate d'éthyle est évaporé à sec, sous vide, la température n'excédant pas 40°C.

3) Chromatographie

Le résidu sec ainsi obtenu est dissous dans 0,1 à 1 cm³ d'une solution de soude 0,1 N. On ajoute alors goutte à goutte une solution de tampon-phosphate 0,1 M, pH = 7,2, jusqu'à ce que la coloration rouge de la solution d'hydrazones soit remplacée par une coloration franchement jaune. On note le volume total de soude et de tampon-phosphate utilisés.

On dépose alors sur papier Arches 302, un volume connu de la solution ainsi obtenue. Ce volume est de 0,2 cm³ habituellement, mais il faut le réduire à 0,1 cm³ pour les urines conte-

nant une forte proportion d'acide α céto-glutarique. Le développement est effectué par chromatographie ascendante, pendant 16 à 18 heures, dans le solvant butanol-éthanol-ammoniaque 0,5 N (70/10/20).

On utilise ici une chromatographie unidimensionnelle.

4) Elution et évaluation quantitative des hydrazones.

Après chromatographie, les hydrazones des acides cétoniques apparaissent sous forme de spots jaunes, nettement séparés.

Le spot le plus proche du point de déposition correspond à l'hydrazone de l'acide α céto-glutarique. On le délimite de façon plus précise aux rayons ultra-violets, où les spots des hydrazones apparaissent sous forme de taches opaques et sombres.

La surface de papier ainsi délimitée est découpée en fines bandelettes et la coloration est extraite du papier en broyant celui-ci avec 1 cm³ d'une solution de carbonate de sodium à 10 %, ceci trois fois de suite. La solution jaune ainsi obtenue est centrifugée pour éliminer tous les débris de papier, et alcalinisée avec 1 cm³ de soude 2N. La coloration rouge qui se développe alors est lue au bout de 15 minutes au spectrophotomètre ($\lambda = 435$).

Pour obtenir les résultats en μ g d'acide α céto-glutarique, il faut se reporter aux valeurs obtenues pour des quantités connues d'acide α céto-glutarique dont on a extrait concurremment l'hydrazone. Ces témoins ont été chromatographiés sur la même feuille de papier que les échantillons d'urine à étudier, et l'on construit, à partir des lectures obtenues pour eux,

une courbe de référence sur laquelle on reporte les valeurs obtenues pour les échantillons inconnus.

En tenant compte, d'une part, du volume total de soude et de tampon-phosphate utilisé pour reprendre le résidu sec constitué par l'ensemble des hydrazones, d'autre part, du volume déposé sur papier, on peut calculer la teneur en acide α céto-glutarique de l'échantillon mis en expérience.

°°°

RESULTATS

Nous avons constaté que l'élimination de l'acide α céto-glutarique, dans l'urine des 24 heures suivant la charge en malate, s'élève, en moyenne de 0,25 mM, par rapport à l'élimination dans l'urine des 24 heures précédant la charge.

Par ailleurs, comme pour les autres acides du cycle, nous avons suivi les variations de l'élimination de l'acide α céto-glutarique, chez 5 sujets normaux de 55 à 75 kg, au cours des 24 heures suivant la charge, en déterminant le taux de cet acide dans des échantillons d'urines recueillis aussitôt après la charge, ainsi que 90 minutes et 12 heures après.

Nous avons constaté ainsi que le taux de l'acide α céto-glutarique, qui est de 0,13 mM par mg de créatinine urinaire avant charge, s'élève à 2,4 mM aussitôt après la fin de la perfusion de malate. Il n'est plus que de 1,9 mM dans l'échantillon recueilli 90 minutes après la fin de la perfusion, et de 0,12 mM, 12 heures après.

DISCUSSION

— • —

Il ressort de nos résultats que l'administration de malate provoque une élévation de l'élimination urinaire des acides du cycle tricarboxylique (Figures 3 et 4). On est en droit de se demander dans quels organes et par quel mécanisme ces acides sont formés.

Les résultats d'un certain nombre de travaux antérieurs représentent des arguments en faveur du siège essentiellement intra-rénal du catabolisme du citrate et du succinate. (Sjöström, 1937 ; Martensson, 1940 ; Forssman, 1941). Le problème se pose de savoir si tous les acides du cycle sont également catabolisés dans le rein (en particulier, les acides du cycle éliminés dans l'urine après charge en malate) et si le cycle tricarboxylique est le seul mécanisme intervenant dans leur catabolisme.

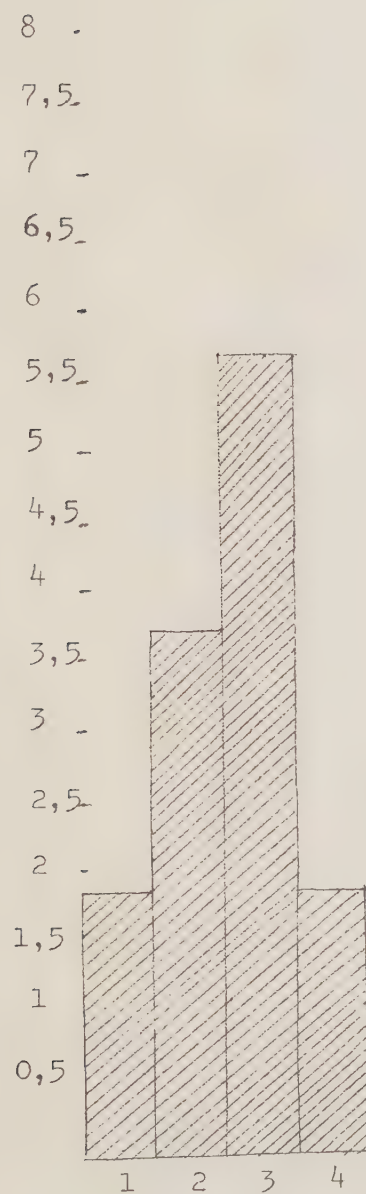
Smith et Orten (1938, 1939) ont étudié le sort du malate administré au rat, et les résultats de leurs travaux ont apporté des arguments en faveur de la formation intra-rénale du citrate éliminé dans l'urine, après charge en malate chez le rat. Les résultats des déterminations du citrate urinaire, sanguin et tissulaire après charge en malate de sodium chez le rat, ont été comparés par ces auteurs à ceux d'un lot d'animaux témoins, ayant reçu la même quantité de sodium sous forme de chlorure de sodium. Smith et Orten ont constaté dans ces conditions, qu'il n'y avait pas de différence significative entre les deux lots d'animaux, pour l'acide citrique sanguin, hépatique et musculaire. Par contre, le taux de l'acide citrique était nettement

Figure 3

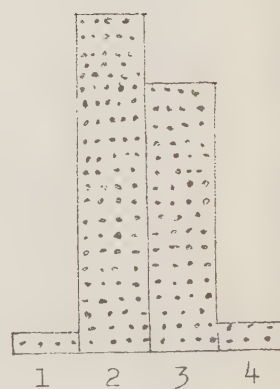
MODIFICATIONS DES PRINCIPAUX ACIDES DU CYCLE
TRICARBOXYLIQUE DANS L'URINE HUMAINE NORMALE,
SOUS L'INFLUENCE D'UNE PERFUSION VEINEUSE
DE 1 mMol./Kg de DL-MALATE

- 1 : avant perfusion
- 2 : aussitôt après la perfusion
- 3 : 90 minutes après
- 4 : 12 heures après

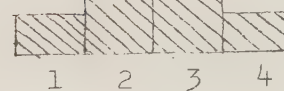
Tous les résultats sont exprimés en mMoles
d'acide pour 1 mg de créatinine urinaire.



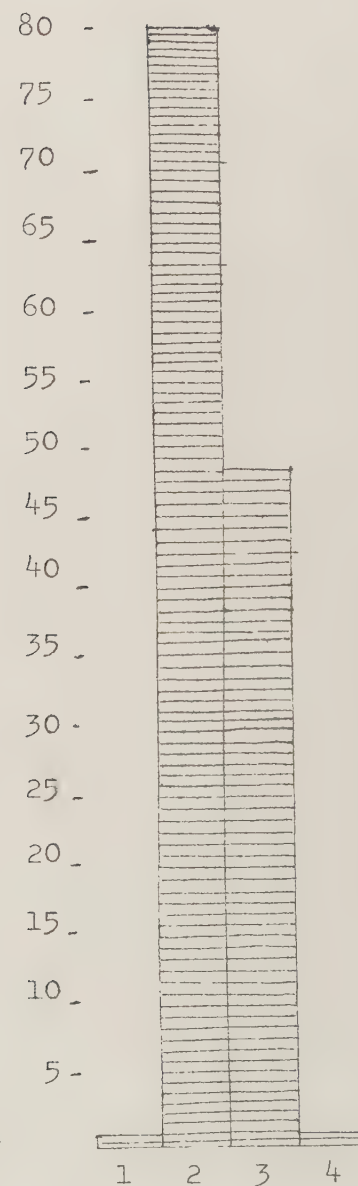
Citrate



α-cétoglutarate



Succinate



Malate

plus élevé dans les reins des animaux ayant reçu du malate, que dans ceux des animaux témoins (14,9 mg contre 6,3 mg). De plus, en réalisant ce même type d'expérience chez des rats néphrectomisés, ces mêmes auteurs ont constaté l'absence de différence significative entre les animaux recevant du malate et ceux recevant du chlorure de sodium, en ce qui concerne les taux de citrate sanguin, musculaire et hépatique. Tous ces résultats soulignent le rôle prépondérant du rein dans la formation de citrate à partir de malate chez le rat.

Enfin, Smith et Orten (1938) ont constaté, toujours chez le rat, que, lors des charges en malate, l'élévation du taux du citrate sanguin était très peu importante, alors qu'au même moment, le taux du citrate urinaire atteignait des valeurs très élevées. Ce fait représente un argument de plus en faveur de la formation intra-rénale du citrate à partir du malate chez le rat.

On est en droit de se demander s'il en est de même pour l'ensemble des acides du cycle tricarboxylique apparaissant dans l'urine lors des charges en malate, et si le cycle tricarboxylique est la seule voie que puisse suivre le malate au cours de son catabolisme, non seulement chez l'animal, mais aussi chez l'homme.

Les charges en malate que nous avons réalisées chez l'homme semblent permettre de s'inscrire en faux contre le bien-fondé d'une telle généralisation.

En effet, si l'on compare le rapport
$$\frac{\text{citrate}}{\alpha \text{ céto glutarate}}$$
 dans l'urine des 24 heures précédant une charge en malate, à ce même rapport dans l'urine des 24 heures suivant cette charge, on constate, chez l'homme, un abaissement très important de ce rapport, qui

Figure 4

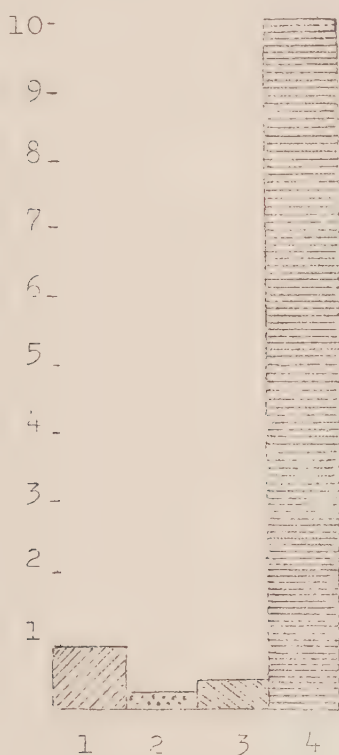
ACIDES DU CYCLE TRICARBOXYLIQUE ELIMINES EN
EXCES DANS L'URINE DES 24 HEURES SUIVANT UNE
PERFUSION DE DL-MALATE CHEZ L'HOMME NORMAL

Les chiffres correspondent à l'excès d'acides éliminés dans l'urine des 24 heures suivant la perfusion, par rapport à l'urine des 24 heures précédant cette perfusion. Ces chiffres sont exprimés en millimoles (moyenne de 6 sujets normaux, de 55 à 75 kg).

La charge a été réalisée sous forme de perfusions veineuses de 1 millimole par kg de poids, d'acide dl-malique, dissous dans 250 cm³ d'eau distillée, amené à pH = 7,4, et perfusé en 30 minutes.

Figure 4

Excès d'acides du cycle tricarboxylique éliminés dans l'urine humaine normale après charge en dl-malate.



Colonne 1 : citrate
 " 2 : α -cétoglutarate
 " 3 : succinate
 " 4 : malate

passé de 15,8 avant charge à 6,8 après charge, ce qui indique l'élimination d'un excès relatif d' α céto-glutarate par rapport au citrate (Tableau 1).

La détermination des divers acides du cycle dans les échantillons d'urines recueillis dès la fin de la perfusion, ainsi que 90 minutes et 12 heures après, nous ont permis d'étudier avec plus de précision les détails de ce processus.

Ainsi que le montre la figure 3, on constate un décalage dans le temps, entre les pics respectifs d'élimination de l' α céto-glutarate et du citrate. Le taux de l' α céto-glutarate urinaire atteint son maximum dans l'échantillon d'urine recueilli aussitôt après la fin de la perfusion, tandis que celui du citrate n'atteint son maximum que dans l'échantillon recueilli 90 minutes après la fin de la perfusion. Ce décalage est un argument contre la conception de la formation de l' α céto-glutarate à partir du citrate, telle qu'elle devrait exister si l'on supposait que le malate injecté était catabolisé par la seule voie du cycle tricarboxylique.

Le tableau 1 indique les rapports entre les divers acides du cycle éliminés dans les échantillons d'urines recueillis à différents intervalles au cours des 24 heures suivant la charge en malate. L'étude de ces rapports souligne le fait que l'accroissement prépondérant de l' α céto-glutarate précède dans le temps l'accroissement du citrate, puisque le rapport

<u>citrate</u>	
α céto-glutarate	s'abaisse de 15,8 , avant perfusion, à 1,55 aussitôt après , et remonte ensuite peu à peu.

Cette augmentation immédiate et prépondérante de l' α céto-glutarate, permet de supposer l'existence, à côté du cycle tricarboxy-

lique, d'une autre voie métabolique. Il est probable qu'intervient ici une transamination entre l'oxalo-acétate (résultant du malate injecté) et le glutamate, donnant lieu à la formation d'aspartate et d' α céto-glutarate.

Il est logique de penser qu'une telle transamination n'est pas localisée dans le rein, mais plutôt dans le foie et le coeur, organes qui sont particulièrement riches en transaminase glutamique-oxalo-acétique (Wroblewski, 1956).

Nous pensons ainsi avoir mis en évidence le fait que, chez l'homme, le cycle tricarboxylique n'est pas le seul mécanisme intervenant dans le catabolisme du malate. En dehors de cette voie métabolique intervient un processus différent, qui semble être une transamination de l'oxalo-acétate avec le glutamate et qui donne lieu à la formation d'un excès relatif d' α céto-glutarate par rapport au citrate.

TABEAU I

--:-

PRINCIPAUX RAPPORTS DES ACIDES DU CYCLE
TRICARBOXYLIQUE DANS L'URINE HUMAINE NORMALE APRES
CHARGE EN DL-MALATE

	<u>Malate</u> <u>Citrate</u>	<u>Citrate</u> <u>α-cétoglutarate</u>	<u>α-cétoglutarate</u> <u>succinate</u>	<u>Succinate</u> <u>malate</u>
Avant charge	<0,16	15,8	>0,35	-
Aussitôt après	21,2	1,55	1,59	0,02
90 minutes après	8,4	3,02	1,31	0,03
12 heures après	<0,16	13,2	>0,41	-

CONCLUSIONS

-:-

Nous avons étudié l'influence de perfusions de dl-malate sur l'élimination urinaire des acides du cycle tricarboxylique chez l'homme normal. Nous avons constaté que ces perfusions déterminent un accroissement sélectif de l'élimination de ces acides. L'étude quantitative de cet accroissement a mis en évidence un excès relatif d' α -céto-glutarate par rapport au citrate. Ce fait indique que, chez l'homme, le malate ne se métabolise pas uniquement par la voie du cycle tricarboxylique, mais qu'intervient aussi un processus différent, qui semble être une transamination entre le glutamate et l'oxalo-acétate formé à partir du malate.

-:-

Vu :
Le Président :
signé : M.F. JAYLE

Vu :
Le Doyen :
Signé : L.BINET

Vu et Permis d'Imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris
signé : Jean SARRAILH

BIBLIOGRAPHIE

-:-

BARRENSCHEEN H.K. et DREGUSS M.

Biochem. Z., 233, 305, 1931

BOSER H.

Die Naturwissenschaften 42, 40, 1955

BRAY H.G., THORPE W.V. et WHITE K.

Biochem.J., 46, 271, 1950

BRYANT F. et OVERELL B.T.

Biochim. Biophys. Acta, 10, 471, 1953

BUEDING E. et WORTIS H.

J. Biol. Chem., 133, 585, 1940

BUSCH H. et POTTER van R.

J. Biol. Chem., 198, 71, 1952

CASE E.H.

Biochem. J., 26, 753, 1932

CAVALLINI D., FRONTALI N. et TOSCHI G.

Nature, 163, 568, 1949 (a)

CAVALLINI D., FRONTALI N. et TOSCHI G.

Nature, 164, 792, 1949 (b)

CHEFTEL R.L., MUNIER R. et MACHEBOEUF M.

Bull. Soc. Chim. Biol., 33, 840, 1951

DAKIN M.D. et DUDLEY H.W.

J. Biol. Chem. 15, 128, 1913

DUNCAN R.E.B. et PORTEOUS J.W.

Analyst, 78, 641, 1953

EL HAWARY M.F.S. et THOMPSON R.H.S.

Biochem. J., 53, 340, 1953

ETTINGER R.H., GOLDBAUM L.R. et SMITH L.H.

J. Biol. Chem., 199, 531, 1952

FORSSMAN S.

Acta Physiol.Scand., 2, Suppl. 5, 121 pp.
1941

FRIEDEMANN T.E. et HAUGEN G.E.

J. Biol. Chem., 147, 415, 1943

FURTH O. et HERMANN H.

Biochem. Z., 280, 448, 1935

GAFFNEY G.W., SCHREIER K., DI FERRANTE N. et
ALTMAN K.I.

J. Biol. Chem., 206, 695, 1954

GEY F.K.

Rev.Internat. Vitaminologie, 25, 21,
1953

ISHERWOOD F.A. et HANES C.S.

Biochem. J., 55, 824, 1953

KOLTHOFF I.M. et LAITINEN H.A.

pH and electro-titrations
Wiley edit., New-York, 1948

KOMETIANI P.A.

Z. Analytical Chemie, 80, 359, 1931

KREBS H.A., SALVIN E. et JOHNSON W.A.

Biochem. J., 32, 113, 1938

KREBS H.A.

Brit. Med. Bull., 9, 97, 1953

KREBS H.A.

Angew.Chem., 66, 313, 1954

KRUSIUS F.E.

Acta Physiol. scand., 2, Suppl. 3,
162 pp., 1940

LU G.D.

Biochem.J., 33, 249, 1939

Mc ARDLE B.

Biochem. J., 60, 647, 1955

MARTENSSON J.

Acta Phys. scand., 1, suppl. 2, 96 pp.,
1940

NATELSON S., LUGOVOY J.K. et PINCUS J.B.

J. Biol. Chem., 170, 597, 1947

NORDMANN R., GAUCHERY O., du RUISSEAU J.P.,
THOMAS Y. et NORDMANN J.

Compt. rend. Acad. Sci., 238, 2459,
1954 (a)

NORDMANN R., GAUCHERY O., du RUISSEAU J.P.,
THOMAS Y. ET NORDMANN J.

Bull. Soc.Chim.Biol., 36, 1461,
1954 (b)

NORDMANN R., GAUCHERY O., du RUISSEAU J.P.,
THOMAS Y. et NORDMANN J.

Ibid., 36, 1641, 1954 (c)

NORDMANN J. et NORDMANN R.

Les résines d'échange ionique en médecine et en biologie
104 pp., in Actualités biologiques,
vol. 1, Exp. Sci.Fr. édit., Paris,
1954 (d)

NORDMANN J., du RUISSEAU J.P. et NORDMANN R.

Chromatographie quantitative sur papier

des acides du cycle tricarboxylique.
Communic. au 3ème Congr. Intern. Biochim.
Bruxelles, 1955 (a)

NORDMANN R., du RUISSEAU J.P. et NORDMANN J.
Révélation différentielle de l'acide
aconitique en chromatographie sur papier
Communic. au 3ème Congr. Intern. Biochim.
Bruxelles, 1955 (b)

NORDMANN J., NORDMANN R., GAUCHÈRY O., MARTY A.
et du RUISSEAU J.P.
Bull. Soc. Chim. Biol., 37, 325, 1955 (c)

NORDMANN J., NORDMANN R., du RUISSEAU J.P. et
GAUCHÈRY O.
Rev. franç. Etud. clin. Biol., 1, 67,
1956

ORTEN J.M. et SMITH A.H.
J. Biol. Chem., 117, 555, 1937

ORTEN J.M. et SMITH A.H.
J. Biol. Chem., 128, 101, 1939

OWEN J.A., IGGE B., SCANDRETT F.J. et
STEWART C.P.
Biochem J., 58, 426, 1954

PEDERSEN K.J.
J. Am. Chem. Soc., 51, 2098, 1929

PEDERSEN K.J.
Ibid., 58, 240, 1936

PETERS R.A. et THOMPSON R.H.S.
Biochem. J., 28, 916, 1934

PETERS R.
Brit. Med. Bull., 9, 116, 1953

POZZI-ESCOT M.E.
Bull. Ass. Chim., 63, 363, 1946

REID R.L. et LEDERER M.

Biochem.J., 50, 60, 1951

SALANT W., LIVINGSTON A.E. et CONNET H.

J. Pharmacol. Exp. Therap., 10, 129,
1917

SIMOLA P.E. et KRUSIUS F.E.

Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 261
209, 1939

SJÖSTRÖM P.

Acta Chir. Scand., 79, Suppl. 49, 1937

SMITH A.H. et ORTEN J.M.

J. Biol. Chem., 124, 43, 1938

STAHR L.

Nord Tidskr. Pharm., 2, 141, 1895

TAUSSKY H.H. et SHORR E.

J. Biol. Chem., 169, 103, 1947

TAYLOR T.G.

Biochem. J., 54, 48, 1953

WEIL-MALHERBE H. et BONE A.D.

Biochem.J., 45, 377, 1949

WIIG E.O.

Journ. Physikal. Chem., 32, 961,
1928

WROBLEWSKI F., FRIEND C., NYDICK I.,

RUEGSEGGER P. et LA DUE J.S.

J. Clin. Invest., 35, 726, 1956

